



Universitat Autònoma de Barcelona
Departament de Bioquímica i Biologia Molecular
Unitat de Ciències

Distribución de las alcohol deshidrogenasas ADH1 y ADH4 en tejidos de rata

Relevancia en el metabolismo de etanol y retinoides

Memoria presentada por

Susana Eva Martínez Rodríguez

para adquirir el grado de Doctora en Bioquímica y Biología Molecular

Trabajo realizado en el Departament de Bioquímica i Biologia Molecular
de la Facultat de Ciències de la Universitat Autònoma de Barcelona, dirigido por
los Doctores Jaume Farrés i Vicén y Xavier Parés i Casasampera

Jaume Farrés i Vicén

Xavier Parés i Casasampera

Susana Eva Martínez Rodríguez

Bellaterra, 25 de abril de 2002

A mi hermana Laura,

que en su continencia tantas veces me ha demostrado su amor

Sentimos que aun cuando todas las *posibles*
cuestiones científicas hayan recibido respuesta,
nuestros problemas vitales todavía no se han rozado b m a s m í n i m o .
Por supuesto que entonces ya no queda pregunta alguna;
y esto es precisamente la respuesta.

Ludwig Wittgenstein
Tractatus Logico-Philosophicus

AGRADECIMIENTOS

Esta Tesis ha llegado a su fin. Ahora que puedo pararme y mirar atrás, siento que el camino recorrido ha valido la pena. Este periodo ha sido intenso: la tesis no sólo significa el final de un trabajo de investigación y de formación científica, sino también una rica etapa de mi vida personal. Es difícil resumir en unas líneas las vivencias, sensaciones y sentimientos que han acompañado al trabajo experimental de cada día. Ahora, tan sólo me gustaría reconocer y agradecer a todas esas personas que han formado parte de mi vida en estos años y que, de una u otra forma, han estado conmigo y han hecho posible que llegara este momento.

En primer lugar a mis directores de Tesis: A Jaume, que me aceptó en el laboratorio cuando yo era aún estudiante. Ambos empezamos nuevos proyectos, lo que ha sido duro, pero también emocionante. Sobre todo agradezco su sereno ánimo en los momentos de más incredulidad, cuando se piensa en tirar la toalla y por enseñarme que la paciencia y la generosidad tienen sentido. Y a Xavier, que me acogió con entusiasmo en el grupo y ha sido un buen director y seguidor de mi trabajo. Le estoy especialmente agradecida por escucharme y ayudarme cuando más lo he necesitado. Agradecerle, a ambos, la cuidadosa corrección y discusión de esta memoria.

A Alberto, al que yo seguía por todos los rincones de la Unidad: él me enseñó a moverme en el laboratorio. Lo más importante es que con el tiempo se ha convertido en un gran amigo, uno de esos que sé que serán para toda la vida.

Al resto de los compañeros del grupo, a los que han pasado y a los que todavía están y en especial a Joan, al que conocí poco y que me inició en el mundillo del cultivo celular; a Abdellah por la pasión que pone en todo lo que hace; a Josep María por su sensibilidad, su resistencia y por estar siempre tan cerca; a Chari por la serenidad, generosidad y belleza que irradia, también por lo mucho que me ha hecho comprender; a Carol, por el tiempo en que compartimos laboratorio, cotilleos y risas; a Hakima, por su constancia y fortaleza en los momentos más difíciles; a Maykelis y a Eva, por los cafés y su agradable compañía; a Silvia y a Ana María, mis compañeras y buenas amigas en los últimos tiempos: a Ana María, por el cariño y el calor que me ha brindado, y a Silvia por las largas conversaciones sobre la vida y esas risas tontas y sin motivo que tan bien nos sientan; además trabajar con ella ha sido un gustazo; a Dámaso, por las charlas y ese extraño humor que compartimos; a Albert y a Emma, por ser mis compañeros de dichas y desdichas en el laboratorio. Y finalmente, a Oriol y Sergio, a quienes deseo mucha suerte, porque seguro la necesitarán en la etapa que ahora inician. A Sergio, en especial, por la energía y entusiasmo que ha puesto en la continuación de este trabajo.

A Julia, compañera y amiga. Agradecerle la colaboración y ayuda que me ha brindado durante una importante etapa de la tesis.

A Pepi Sabrià, por sus conocimientos del cerebro humano (en términos anatómicos, se entiende). También por su sincero interés en mi trabajo.

A mis compañeros de Unidad, gracias por ponerle color a este largo camino. Hay mucho que recordar. Y en especial a Imma por su disponibilidad en todo momento y para cualquier cosa, y por esa energía que desprende y contagia. Y a Salva por su ayuda logística en artículos, congresos y seminarios y, evidentemente, en esta memoria. También por su capacidad de entrega en todo lo que hace.

Finalmente, a las personas que más quiero:

A Laura, porque su amistad y su alegría de vivir son un regalo desde hace años. A Lidia y a Manuel, por las largas e intensas horas de sobremesa que nos hemos marcado y porque verles y estar con ellos es un remanso para mi ánimo. A Lidia, en especial, por dejarse querer y confiar en mí. A Jero, por su sabiduría y por el cariño y aliento que me transmite. A Gemma, mi mejor amiga, que me acompaña, desde hace muchos años. De ella aprendo día a día, y es en ella donde se materializa el significado de la palabra Amistad. Y a Francis, por el amor que un día surgió entre nosotros, que más tarde se transformó pero no disminuyó. Y por lo hermoso de lo que ahora compartimos.

A Bernat, por ser inseparable compañero de laboratorio durante toda la tesis, agradecerle además que, en los últimos años, haya sido amigo, confidente y un lugar a donde ir para beber. También por escucharme e inquietarme día a día. Y sobre todo, por tu dulce sonrisa y tus tentadoras maneras.

A mis padres que, entre otras muchas cosas, les agradezco su apoyo y ayuda incondicional, y el interés y admiración que sienten por mi mundo. En especial quiero reconocer a mi madre por la fuerza y belleza que transpira. Y a mi padre la extraordinaria capacidad de ilusionarse por las cosas más sencillas y esa emoción que, aunque no quiera, le sale por los poros.

Finalmente, a Laura, simplemente por ser mi hermana. Es a ti, a quien dedico esta Tesis.

La realización de esta Tesis ha sido posible gracias al *Comissionat per a Universitats i Recerca de la Direcció General de Recerca de la Generalitat*, por la beca otorgada durante el periodo 1995-1998; y a la *Dirección General de Enseñanza Superior e Investigación Científica* (PB98-0855 and BMC2000-0132) y *Comisión de la Unión Europea* (BIO4-CT97-2123), por las ayudas que han subvencionado parte importante de este trabajo.

ÍNDICE

Agradecimientos	<i>i</i>
Índice	<i>v</i>
Índice de tablas y figuras	<i>xiii</i>
Abreviaturas	<i>xv</i>
RESUMEN	<i>xvii</i>
INTRODUCCIÓN	
1 LA ALCOHOL DESHIDROGENASA	1
1.1 ADH clase I (ADH1)	2
1.2 ADH clase II (ADH2)	3
1.3 ADH clase III (ADH3)	3
1.4 ADH clase IV (ADH4)	5
1.5 ADH5 y ADH6	7
2 FUNCIONES FISIOLÓGICAS DE LA ADH	7
2.1 Metabolismo del etanol y acetaldehído	7
2.1.1 Propiedades del alcohol y fuentes de producción	7
2.1.2 Absorción y distribución del etanol	9
2.1.3 Eliminación del etanol. Implicación de la ADH en el metabolismo de etanol	10
2.1.3.1 Metabolismo hepático	10
2.1.3.2 Metabolismo extrahepático del etanol	10
2.1.3.3 Metabolismo de etanol de primer paso	11
2.1.4 Metabolismo del acetaldehído	12
2.1.4.1 Toxicidad del acetaldehído	12
2.1.4.2 Eliminación del acetaldehído	13
2.2 Metabolismo y mecanismo de acción de los retinoides	13
2.2.1 Propiedades de los retinoides	13
2.2.2 Absorción y biosíntesis	14
2.2.3 Síntesis de ácido retinoico	15

Índice

2.2.3.1 Oxidación del retinol	15
2.2.3.2 Oxidación del retinal	16
2.3 Mecanismos de acción de los retinoides	17
2.4 Eliminación de productos de la peroxidación lipídica por la ADH	21
2.5 Metabolismo de las monoaminas	21
3 PATOLOGÍA ALCOHÓLICA	22
3.1 Lesiones hepáticas	22
3.2 Alteraciones en el sistema vascular	22
3.3 Manifestaciones gastrointestinales del alcoholismo	23
3.4 Efectos del consumo del alcohol en el SNC	24
3.5 Efectos del alcohol sobre la visión	25
4 INTERACCIÓN ENTRE ETANOL Y RETINOIDES	26
OBJETIVOS	27
MATERIAL Y MÉTODOS	
1 OBTENCIÓN DEL MATERIAL BIOLÓGICO	29
1.1 Tejidos humanos	29
1.2 Tejidos de rata	29
1.3 Cultivos celulares	29
2 MÉTODOS DE TRABAJO CON CULTIVOS CELULARES	30
2.1 Trabajo en condiciones asépticas	30
2.2 Mantenimiento de células en cultivo	30
2.3 Almacenamiento de células	30
2.3.1 Congelación de células	31
2.3.2 Descongelación de células	31
2.4 Recuento de células y determinación de la viabilidad celular	31
2.5 Tratamiento de células con retinoides	32
3 PREPARACIÓN, ANÁLISIS Y MANIPULACIÓN DE DNA	32
3.1 Purificación y concentración del DNA de soluciones acuosas	32
3.2 Separación y obtención de fragmentos de DNA	33

3.2.1 Electroforesis de DNA en geles de agarosa	33
3.2.2 Purificación de fragmentos de DNA a partir de geles de agarosa	34
3.3 Digestión con enzimas de restricción. Obtención de mapas de restricción	34
3.4 PCR	34
3.5 Clonación y secuenciación de DNA	35
3.5.1 Preparación del vector	35
3.5.1.1 Vectores	35
3.5.1.2 Extracción de DNA plasmídico	36
3.5.1.3 Desfosforilación del vector de clonación	36
3.5.2 Preparación del inserto de DNA	37
3.5.2.1 Procedencia del inserto	37
A. Síntesis de cDNA. RT-PCR	37
B. Obtención de extremos romos	40
C. Fosforilación de los extremos del inserto	41
3.5.3 Ligación vector-inserto	41
3.5.4 Preparación y transformación de células competentes de <i>E. Coli</i>	42
3.5.5 Análisis de los transformantes y selección de los clones de interés	42
3.5.6 Secuenciación	43
3.5.7 Análisis de las secuencias en los bancos de datos genéticos	43
4 MÉTODOS DE DETECCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LA ADH	43
4.1 Detección del enzima activo	43
4.1.1 Homogeneización de los tejidos	43
4.1.1.1 Tejidos humanos	43
4.1.1.2 Tejidos de rata	44
4.1.1.3 Cultivos celulares	44
4.1.2 Determinación cuantitativa de proteínas	44
4.1.3 Determinación de la concentración de DNA celular	44
4.1.4 Ensayos de actividad ADH por espectrofotometría	45
4.1.5 Electroforesis en gel almidón	46
4.1.5.1 Preparación del gel y condiciones de electroforesis	46

Índice

4.1.5.2	Tinción del gel por actividad enzimática	46
4.1.6	Electrofocalización analítica	47
4.1.7	Tinción histoquímica	47
4.1.7.1	Fijación y crioconservación de los tejidos	47
4.1.7.2	Preparación de los cortes de tejido	48
4.1.7.3	Tinción de los cortes por actividad enzimática	48
4.2	Detección de proteína ADH	49
4.2.1	Preparación de anticuerpos específicos anti-ADH4	49
4.2.1.1	Obtención y purificación de proteína ADH4 humana recombinante	49
4.2.1.2	Inmunización y obtención de sangrías	49
4.2.1.3	Purificación del anticuerpo	50
4.2.2	Electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS- PAGE)	50
4.2.3	Transferencia proteica a membranas e inmunodetección o <i>Western blotting</i>	51
4.2.4	Inmunocitoquímica o inmunohistoquímica	53
4.3	Métodos de detección de RNA	54
4.3.1	Manipulación en condiciones libres de ribonucleasas	54
4.3.2	Extracción del RNA	55
4.3.2.1	Extracción de RNA total con isotiocianato de guanidino	55
A.	A partir de tejidos	55
B.	A partir de cultivos celulares	55
4.3.2.2	Purificación del RNA poliA ⁺	56
4.3.2.3	Determinación de la concentración de RNA	57
4.3.3	Análisis por transferencia <i>Northern</i>	57
4.3.3.1	Electroforesis en gel de agarosa-formaldehído y transferencia a membrana	57
4.3.3.2	Marcaje radioactivo de una sonda de DNA	58
4.3.3.3	Prehibridación e hibridación de la membrana	59
4.3.3.4	Lavados post-hibridación	60
4.3.3.5	Cuantificación de la señal radioactiva	60
4.3.4	RT-PCR y detección no radioisotópica	60
4.3.4.1	Síntesis del cDNA	61
4.3.4.2	Marcaje de sondas con digoxigenina mediante PCR	61

4.3.4.3	Transferencia de DNA a filtros de Nylon	62
4.3.4.4	Hibridación con la sonda	62
4.3.4.5	Detección quimioluminiscente y/o cromogénica	62
4.3.5	Hibridación <i>in situ</i>	63
4.3.5.1	Preparación de las ribosondas marcadas con digoxigenina	63
A.	Linearización del plásmido con el inserto	63
B.	Transcripción <i>in vitro</i>	64
C.	Análisis del marcaje de la sonda	68
4.3.5.2	Inclusión de los tejidos en parafina	69
A.	Fijación de los tejidos	69
B.	Deshidratación de los tejidos	70
C.	Diafanización e infiltración con parafina	70
4.3.5.3	Preparación de los bloques de parafina	71
4.3.5.4	Obtención de los cortes de tejido	71
4.3.5.5	Tratamiento de los cortes de tejido	72
4.3.5.6	Hibridación	74
4.3.5.7	Lavados post-hibridación	74
4.3.5.8	Detección de los híbridos RNA-RNA	75
4.3.5.9	Montaje de las preparaciones	75
4.3.5.10	Análisis en el microscopio y adquisición de imágenes	76

RESULTADOS

1	DISTRIBUCIÓN EXTRAHEPÁTICA DE LA ADH EN RATA	77
1.1	Localización de la ADH en el sistema vascular	77
1.1.1	Detección de la actividad ADH mediante electroforesis en gel de almidón	77
1.1.2	Detección del mRNA de ADH4 mediante RT-PCR quimioluminiscente	77
1.1.3	Detección de la actividad ADH por tinción histoquímica	78
1.2	Localización de la ADH en el tracto digestivo	79
1.2.1	Detección de la actividad ADH en tejido gastrointestinal	80
1.2.2	Detección de actividad ADH	82
1.2.3	Inmunodetección de ADH4 en tejido gastrointestinal de rata	83

Índice

1.2.4 Localización celular de la ADH en el tracto gastrointestinal mediante ISH e IHC	83
1.2.4.1 Lengua	85
1.2.4.2 Esófago	85
1.2.4.3 Estómago	91
1.2.4.4 Intestino delgado	96
1.2.4.5 Intestino grueso	96
1.3 Localización de la ADH en el SNC	101
1.3.1 Anatomía del SNC de rata	101
1.3.2 Detección de la ADH en homogeneizados de cerebro	103
1.3.3 Inmunodetección de la ADH en cerebro de rata	103
1.3.4 Detección de la expresión de la ADH mediante hibridación <i>in situ</i>	105
1.3.4.1 Expresión de la ADH en cerebelo	105
1.3.4.2 Expresión de la ADH en la formación hipocampal	108
1.3.4.3 Expresión de la ADH en la corteza cerebral	111
1.3.4.4 Localización celular y subcelular de los transcritos de ADH	115
1.3.4.5 Expresión de la ADH en meninges, ventrículos y vasculatura asociada al SNC	117
1.3.5 Localización de la expresión de ADH4 en cerebelo de ratón	120
1.4 Localización de la ADH en ojo	122
2 REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE LOS GENES ADH EN RESPUESTA A ÁCIDO RETINOICO	127
2.1 Morfología y crecimiento de las células H4IIEC3	128
2.2 Análisis electroforético del patrón de ADH en las células H4IIEC3	129
2.3 Determinación de actividad ADH en células de H4IIEC3	130
2.4 Análisis por transferencia <i>Northern</i> del patrón de expresión de ADH en las células H4IIEC3	131
2.5 Efecto de la eliminación del suero sobre la actividad ADH	132
2.6 Efecto del AR sobre la expresión de la ADH	133
DISCUSIÓN	137
1 CONSECUENCIAS FISIOLÓGICAS DE LA LOCALIZACIÓN TISULAR DE LA ADH	138

1.1 Expresión de la ADH en el sistema vascular	
138	
1.2 Expresión y papel fisiológico de la ADH en el tracto digestivo	139
1.2.1 ADH gastrointestinal y metabolismo de etanol	140
1.2.2 ADH gastrointestinal y peroxidación lipídica	142
1.2.3 ADH gastrointestinal y metabolismo de retinoides	142
1.2.4 ADH gastrointestinal y patología alcohólica	143
1.3 Papel fisiológico de ADH1 y ADH4 en el cerebro adulto de rata	
145	
1.3.1 ADH de cerebro y metabolismo de etanol	146
1.3.2 ADH de cerebro y metabolismo de retinoides	147
1.3.2.1 Posible papel de la ADH en la plasticidad neuronal y la neurogénesis	148
1.3.2.2 Barrera hematoencefálica y ADH	149
1.3.3 ADH de cerebro y metabolismo de las monoaminas	149
1.4 Posibles funciones de ADH4 en los tejidos oculares	150
1.4.1 Función de ADH4 como 11- <i>cis</i> -retinol deshidrogenasa en el ciclo visual	150
1.4.2 Función de ADH4 como todo- <i>trans</i> -retinol deshidrogenasa en los tejidos oculares	151
1.4.3 Función protectora de ADH4 frente a la peroxidación lipídica	153
2 EXPRESIÓN Y REGULACIÓN DE LA ADH POR AR EN HEPATOMA DE RATA	
	153
DISCUSIÓN FINAL	155
CONCLUSIONES	159
BIBLIOGRAFÍA	163

ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

TABLAS

1.	Nomenclatura propuesta para las ADH de algunos vertebrados	2
2.	Patrón de expresión de las diferentes clases de ADH en mamífero	5
3.	Constantes cinéticas de ADH1 y ADH4 de rata frente a sustratos fisiológicos	6
4.	Sustratos fisiológicos y vías metabólicas en las que están implicadas las ADH	8
5.	Miembros de la familia ALDH con actividad retinal deshidrogenasa en mamífero	17
6.	Efectos del alcohol sobre el tracto digestivo	23
7.	Enfermedades neurológicas más comunes asociadas al alcoholismo	25
8.	Oligonucleótidos utilizados como cebadores en la PCR de fragmentos de cDNA de ADH1 y ADH4 de rata y humano	40
9.	Deshidratación de las secciones a concentraciones crecientes de etanol	73
10.	Concentraciones de proteinasa K óptimas en función del tejido	74
11.	Subdivisiones anatómicas del cerebro	101
12.	Localización del mRNA de ADH1 y ADH4 en el SNC mediante ISH	122
13.	Distribución de ADH4 en los tejidos oculares	127
14.	Actividad ADH de homogeneizados de células H4IIEC3 y tejidos de rata	130
15.	Actividad FALDH y ALDH en homogeneizados de células H4IIEC3	131
16.	Efecto de la eliminación del suero sobre la actividad ADH1 y ADH4 de las células H4IIEC3	133

FIGURAS

1.	Electroforesis en gel de almidón y tinción por actividad con muestras de tejidos humanos y de rata	4
2.	Sistemas enzimáticos de oxidación del etanol	12
3.	Estructura química de diferentes retinoides	14
4.	Vía de síntesis de AR	18
5.	Funciones de los retinoides	19
6.	Comprobación de la reacción de síntesis de la primera cadena de cDNA	38
7.	Electroforesis en gel de agarosa al 1% (p/v) de los productos de PCR para comprobar la incorporación de la digoxigenina	61
8.	Etapas de la técnica de hibridación <i>in situ</i>	65
9.	Esquema de la síntesis de ribosondas y de la hibridación <i>in situ</i> en las secciones de tejido	66
10.	Sondas de RNA marcadas con digoxigenina por transcripción <i>in vitro</i> a partir de DNA linearizado	67
11.	(A) Sondos de RNA hidrolizadas por hidrólisis alcalina. (B) Transferencia a membrana de las sondas de RNA hidrolizadas marcadas con digoxigenina del gel de agarosa mostrado en (A)	68
12.	Comprobación de la especificidad de las sondas sentido y antisentido para ADH4	69
13.	Detección del mRNA de ADH4 de los vasos sanguíneos de rata por RT-PCR	78
14.	Estructura de una arteria y una vena donde se especifican las diferentes capas histológicas	79
15.	Detección histoquímica de ADH de secciones de arteria de rata	80
16.	Esquema del tracto gastrointestinal de la rata (A) y humano (B)	81
17.	Electroforesis en gel de almidón de homogeneizados del tracto gastrointestinal de rata	81
18.	Actividad ADH a lo largo del tracto gastrointestinal en mU/mg de proteína	82
19.	Inmunodetección de ADH4 en el tracto gastrointestinal de rata	83
20.	Sección transversal del tubo digestivo (esófago)	84
21.	Distribución de la proteína ADH4 en la lengua de rata mediante IHC	87
22.	Localización del mRNA de ADH4 en esófago de rata adulta mediante ISH	88
23.	Distribución de la proteína ADH4 en el esófago de rata mediante IHC	89

24.	Localización de ADH4 en secciones de esófago humano mediante ISH e IHC	90
25.	Esquema del estómago humano	91
26.	Cuerpo del estómago de rata en estado no distendido. Tinción histológica con Giemsa	92
27.	Localización del mRNA de ADH1 y ADH4 en estómago de rata adulta mediante ISH	93
28.	Distribución de ADH1 en la mucosa gástrica de rata mediante ISH	94
29.	Distribución de ADH4 en la mucosa gástrica de rata mediante ISH	95
30.	Detección del mRNA de ADH4 en la unión gastroduodenal mediante ISH	97
31.	Distribución del mRNA de ADH1 y ADH4 en el yeyuno e íleon de rata	98
32.	Distribución de ADH1 y ADH4 en el colon de rata	99
33.	Distribución de ADH1 y ADH4 en el recto de rata	100
34.	Sección sagital del cerebro de rata	102
35.	Electroforesis en gel de almidón de homogeneizados de tejido nervioso de rata adulta (a)	103
36.	Electroforesis en gel de almidón de homogeneizados de tejido nervioso de rata adulta (b)	104
37.	Inmunodetección de la ADH4 en cerebro de rata	104
38.	Localización del mRNA de ADH1 y ADH4 en secciones de cerebelo de rata adulta mediante ISH	106
39.	Localización del mRNA de ADH4 en la medula cerebelar mediante ISH	107
40.	Localización del mRNA de ADH4 en secciones de cerebelo de ratón adulto mediante ISH	108
41.	Localización del mRNA de ADH4 en secciones de cerebelo humano mediante ISH	109
42.	Localización del mRNA de ADH4 en los vasos de cerebelo humano mediante ISH	109
43.	Formación hipocampal de la rata	110
44.	Localización de ADH1 y ADH4 en la formación hipocampal de rata mediante ISH	111
45.	Esquema de las capas celulares de la corteza cerebral	112
46.	Localización del mRNA de ADH1 y ADH4 en la corteza frontal de rata adulta mediante ISH	113
47.	Localización del mRNA de ADH1 y ADH4 en la corteza temporal de rata adulta mediante ISH	114
48.	Localización del mRNA de ADH1 y ADH4 en la corteza piriforme de rata adulta mediante ISH	115
49.	Localización subcelular del mRNA de ADH4 mediante ISH	116
50.	Detección del mRNA de ADH4 en las células de Purkinje del cerebelo mediante ISH	117
51.	Detección de la expresión de ADH4 en las leptomeninges que recubren el SNC por ISH	118
52.	Localización del mRNA de la ADH4 en el sistema ventricular mediante ISH	119
53.	Localización del mRNA de la ADH4 en el sistema vascular del SNC mediante ISH	119
54.	Detección de la actividad ADH en el cerebelo de ratón mediante tinción histoquímica	121
55.	Dibujo esquemático de un corte horizontal meridional de ojo humano a pequeño aumento	123
56.	Sección del ojo de rata. Tinción con hematoxilina	124
57.	Localización de ADH4 en el ojo de rata	125
58.	Localización de ADH4 en el cuerpo ciliar mediante IHC	126
59.	Localización del mRNA de ADH4 en el nervio óptico humano mediante ISH	126
60.	Células H4IIEC3 de hepatocarcinoma de rata	128
61.	Electroforesis en gel de almidón, a pH 7,6 y tinción con etanol 200 mM (A) o con 2-buten-1-ol 100 mM (B) o tinción con formaldehído 4,8 mM y glutatión 1 mM (C)	129
62.	Análisis de mRNA de diferentes ADH en las células H4IIEC3 de hepatoma de rata	132
63.	Análisis por transferencia <i>Northern</i> del mRNA de la ADH en las células H4IIEC3 tratadas con ácido retinoico	134
64.	Efecto de la eliminación del suero en el medio de crecimiento sobre el nivel de actividad (A) y de mRNA (B) de la ADH	135
65.	Efecto de los diferentes isómeros de AR sobre el nivel de mRNA de ADH1, ADH3 y ADH4	136
66.	Dibujo esquemático del ciclo visual de los fotorreceptores de vertebrados	152
67.	Modelo de inhibición de la síntesis de ácido retinoico por el metabolismo de etanol	157